

PHÂN LẬP, ĐÁNH GIÁ ĐỘ NHẠY VỚI KHÁNG SINH CỦA VI KHUẨN *Flavobacterium columnare* GÂY BỆNH TRÊN CÁ CHÉP NUÔI TẠI MIỀN BẮC

Trương Đình Hoài^{1,*}, Đặng Thị Hóa¹, Trần Thị Trinh¹, Nguyễn Thị Thanh Loan²,
Nguyễn Văn Phong¹, Nguyễn Thị Hương Giang³, Đoàn Thị Ninh¹, Kim Văn Vạn¹

¹Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Trung tâm Chẩn đoán Thú y Trung ương

³Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

*Email: tdhoai@vnua.edu.vn

TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm xác định một số dấu hiệu đặc trưng của bệnh, phân lập, định danh và đánh giá hiện trạng kháng kháng sinh của vi khuẩn *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá chép ở một số tỉnh miền Bắc. Tổng số 145 mẫu cá chép nghi nhiễm *F. columnare* được thu từ 27 hộ nuôi thuộc 3 tỉnh/thành: Hà Nội, Hải Dương và Bắc Ninh để phục vụ nghiên cứu. Kết quả cho thấy, mẫu cá chép nhiễm bệnh có các dấu hiệu đặc trưng như: Mang xơ trắng, hoại tử, xơ vảy và da bạc màu. Các chủng phân lập được từ cá nhiễm bệnh đều có khuẩn lạc vàng, dạng rẽ đặc trưng, bám sâu vào mặt thạch, vi khuẩn Gram âm, dạng sợi, có tính di động. Sau khi giám định sinh hóa và sinh học phân tử 27 chủng vi khuẩn đại diện của 27 hộ nuôi (1 chủng/hộ) cho thấy, các chủng phân lập được đều là vi khuẩn *F. columnare*. Kết quả cảm nhiễm một chủng đại diện bằng phương pháp ngâm xác định liều gây chết 50% (LD₅₀) là $3,8 \times 10^5$ CFU/ml, cá cảm nhiễm biểu hiện các dấu hiệu điển hình của bệnh tương tự mẫu thu ngoài tự nhiên. Vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trên cá chép có tỷ lệ nhạy cao với 5/6 loại kháng sinh doxycycline, oxytetracycline, amoxicillin, florfenicol, erythromycin, trong khi tỷ lệ chủng kháng với hỗn hợp kháng sinh sulfamethoxazole/trimethoprim khá cao (25,9%). Kết quả nghiên cứu đã cung cấp thông tin quan trọng phục vụ chẩn đoán và là cơ sở để xây dựng biện pháp phòng và kiểm soát bệnh.

Từ khóa: *Flavobacterium columnare*, phân lập, kháng kháng sinh, cá chép.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Cá chép (*Cyprinus carpio*) là loài cá nước ngọt có chất lượng thịt ngon, có mùi thơm và dễ chế biến. Tuy nhiên, cũng giống như nhiều loài cá kinh tế khác, người nuôi cá chép gặp phải những khó khăn, đặc biệt là dịch bệnh ngày càng phức tạp. Một số bệnh nguy hiểm như Koi Herpesvirus (KHV), bệnh hoại tử bã đậu do *Myxobolus* gây ra [1]. Vi khuẩn *F. columnare* thuộc họ Flavobacteriaceae thường phát triển quanh năm, nhưng phát triển mạnh và gây bệnh nặng nhất khi nhiệt độ nước thấp. Theo nghiên cứu của Zhao và cs (2016) [2], vi khuẩn này gây bệnh cho cá chép và gây thiệt hại lớn về kinh tế cho người nuôi. Ngoài ra, tác nhân này cũng đã được báo cáo gây

thiệt hại cho nghề nuôi cá nước ngọt khác như: Cá rô phi, trắm cỏ, chép, cá da trơn [3 - 5]. Bệnh gây ra các biểu hiện như: Hoại tử mang, xơ mòn vảy, tổn thương da, kém ăn và tỷ lệ chết cao [6]. Trong một số trường hợp gây nhiễm trùng huyết khi vi khuẩn xâm nhập từ các tổn thương bên ngoài vào trong cơ thể [7]. Sự hiện diện của các tổn thương trên mang, da và vảy của cá bị bệnh cho thấy, vi khuẩn *F. columnare* có thể sử dụng chất nhầy da cá làm chất nền để phát triển và việc tiếp xúc với chất này sẽ làm thay đổi sự biểu hiện và liên quan đến sự xâm nhập bên ngoài bề mặt của cá.

Khí hậu vụ thu đông và đông xuân ở miền Bắc Việt Nam là một trong những điều kiện thuận lợi cho vi khuẩn *F. columnare* phát triển. Theo nghiên

cứ của Suomalainen và cs (2006) [8], bệnh do *F. columnare* thường bùng phát ở điều kiện nhiệt độ 23 - 28°C, đây cũng là một trong những nguyên nhân khiến vi khuẩn *F. columnare* xuất hiện ngày càng nhiều và diễn biến phức tạp. Thực tế cho thấy, nhiều loài cá nuôi ở miền Bắc như rô phi [9], trắm cỏ [10], nheo Mỹ [11] đã nhiễm bệnh và gây thiệt hại lớn cho người nuôi.

Mặc dù bệnh vi khuẩn *F. columnare* đã được báo cáo trên nhiều loài cá, tuy nhiên tại Việt Nam chưa có các nghiên cứu về bệnh *F. columnare* trên cá chép. Nghiên cứu này được thực hiện để phân lập, đánh giá các đặc điểm bệnh học chủ yếu và tình trạng kháng kháng sinh của *F. columnare* trên cá chép nuôi tại một số tỉnh miền Bắc để cung cấp thông tin phục vụ quá trình kiểm soát và phòng ngừa hiệu quả dịch bệnh tại Việt Nam.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu nghiên cứu

Nghiên cứu được thực hiện trên 145 mẫu cá chép có các biểu hiện nghi nhiễm bệnh do vi khuẩn *F. columnare* được thu từ các đợt bùng phát bệnh tại các vùng nuôi ở miền Bắc năm 2023. Dụng cụ, máy móc và hóa chất phục vụ cho quá trình thu mẫu, nuôi cấy, phân lập, định danh vi khuẩn, đánh giá mức kháng kháng sinh, hệ thống bể để cảm nhiễm và khẳng định tác nhân gây bệnh sau phân lập.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Thu mẫu và sàng lọc mẫu nghi nhiễm

145 mẫu cá chép được thu từ 27 hộ nuôi tại 3 tỉnh/thành là: Hà Nội (n = 37), Hải Dương (n = 71), Bắc Ninh (n = 37) có dấu hiệu nghi nhiễm bệnh do vi khuẩn *F. columnare* bao gồm mang xơ trắng, hoặc xám vàng, cơ thể xuất hiện các vùng nhạt màu, xơ tia vây theo mô tả của các nghiên cứu trước đó để phục vụ nghiên cứu [3]. Cá nhiễm bệnh được vận chuyển về phòng thí nghiệm bằng phương pháp vận chuyển kín hoặc vận chuyển lạnh.

Mẫu cá sau khi thu được sàng lọc sơ bộ sự có mặt của vi khuẩn Gram âm, dạng sợi mảnh ở các vị trí tổn thương bằng phương pháp nhuộm Gram theo mô tả của Declercq và cs (2013) [3] trước khi

nuôi cấy, phân lập. Các dấu hiệu lâm sàng và đặc điểm bệnh tích của cá sau sàng lọc được ghi chép để tổng hợp và nhận diện các dấu hiệu đặc trưng của bệnh.

2.2.2. Nuôi cấy và phân lập vi khuẩn

Mẫu bệnh tại các vị trí tổn thương trên mang, da sau khi sàng lọc có sự xuất hiện của vi khuẩn dạng sợi được ria cấy trên môi trường Tryptone Yeast Extract Salts (TYES) [12]. Các chủng vi khuẩn có khuẩn lạc màu vàng, dạng rẽ phát triển sau 32 - 48 giờ ở nhiệt độ 28°C được phân lập và cấy thuần sẽ được tiến hành tách để nuôi cấy và được lưu giữ trong môi trường có bổ sung glyceron ở điều kiện -80°C.

2.2.3. Xác định đặc điểm hình thái, sinh hóa

Các đặc điểm hình thái, sinh hóa của chủng vi khuẩn thuần sẽ được xác định thông qua nhuộm Gram; soi tươi xác định đặc tính di động, thử các phản ứng catalase, oxidase, hấp thụ thuốc thử red congo được tiến hành theo hướng dẫn của kit thử; thử sắc tố flexirubin bằng dung dịch KOH 20% theo mô tả của Nicky B. Buller (2004) [13]. Các đặc tính hình thái, sinh hoá sẽ được so sánh mức độ tương đồng với chủng chuẩn *F. columnare* ATCC 49513.

2.2.4. Phương pháp tách chiết ADN và giám định vi khuẩn bằng sinh học phân tử

Các chủng vi khuẩn sau định danh sơ bộ bằng phương pháp sinh hoá, được giám định bằng phương pháp sinh học phân tử. Vi khuẩn thuần được nuôi cấy, thu sinh khối và được tách chiết bằng kit Instagen (Bio-rad, Mỹ) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. ADN của các chủng vi khuẩn sau khi tách chiết được bảo quản ở điều kiện -20°C. Cặp mồi đặc hiệu xác định loài *F. columnare* theo nghiên cứu của Welker và cs (2005) [14] được xác định để xác định sự có mặt của gen đích ISR với mồi xuôi FCISRFL: TGCGGCTGGATCACCTCCTTTCTAGAGACA; mồi ngược FCISRR: TAATYRCTAAAGATGTTCTTTCTACTTGTTTG (kích cỡ đoạn gen khuếch đại khoảng 450 – 550 bp). Hỗn hợp của phản ứng PCR bao gồm: 10 µl Gotag green Master Mix (Promega, Anh), 1,5 µl mỗi primer xuôi và ngược, 4 µl nước tách ADN, 3

µl mẫu ADN. Chu trình nhiệt cho phản ứng PCR: Tiền biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 5 phút; 40 chu kỳ lặp lại với biến tính ở nhiệt độ 94°C trong 30 giây, gắn mồi ở nhiệt độ 55°C trong 45 giây, kéo dài ở nhiệt độ 72°C trong 60 giây và giai đoạn kéo dài cuối cùng ở nhiệt độ 72°C trong 7 phút. ADN của chủng *F. columnare* ATCC 49513 được sử dụng làm đối chứng dương, đối chứng âm là hỗn hợp phản ứng không chứa ADN và được thay bằng PBS. Quá trình điện di sử dụng bản gel 1,5% agarose nhuộm bằng dung dịch Redsafe (Intron, Hàn Quốc) và dung dịch đệm Tris-Boarate-EDTA (TBE) được thực hiện ở hiệu điện thế 100 V cường độ 100 mA trong thời gian 30 phút. Kết quả điện di được chụp bằng hệ thống Gel imager (Bio-Rad, Mỹ).

2.2.5. Phương pháp cảm nhiễm và xác định liều gây chết 50% (LD_{50})

Lựa chọn ngẫu nhiên 1 chủng vi khuẩn (FC-CC-HN-06) sau khi giám định PCR để tiến hành cảm nhiễm trên cá chép bằng phương pháp ngâm [10]. Cá chép (35 – 40 g/con) được nuôi thuần trong bể 1.000 L, có sục khí và cho ăn 3% khối lượng cơ thể/ngày và thích nghi trong 1 tuần. Vi khuẩn *F. columnare* thuần được tiến hành nuôi tăng sinh trong 1 L môi trường TYES ở nhiệt độ 28°C trong 48 giờ. Vi khuẩn được thu sinh khối và xác định mật độ ban đầu bằng phương pháp cấy trên đĩa thạch. Sau đó, vi khuẩn sẽ được điều chỉnh về mật độ 10^{10} CFU/ml. Chủng vi khuẩn tiếp tục được pha loãng vào 5 L nước sạch để đạt các nồng độ 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 CFU/ml để ngâm cảm nhiễm. Cá cảm nhiễm có khối lượng 25 g được nuôi thuần 1 tuần trước khi thí nghiệm. Tiến hành cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm 15 con/bể 5 L chứa các nồng độ vi khuẩn khác nhau đã được chuẩn bị trước đó và lô đối chứng không được cảm nhiễm vi khuẩn. Sau khi ngâm cảm nhiễm 2 giờ, cá sẽ được vớt chuyển sang bể nuôi 120 L có sục khí và theo dõi trong 14 ngày. Mỗi nồng độ vi khuẩn cảm nhiễm và lô đối chứng được lặp lại 3 lần.

Các yếu tố môi trường tại các lô thí nghiệm được duy trì trong khoảng phù hợp với sự phát triển bình thường của cá (pH = 7 - 7,5; NO_2^- = 0 mg/l, NH_3 < 0,01 mg/l). Tỷ lệ sống của cá cảm

nhiễm và dấu hiệu lâm sàng của bệnh sẽ được ghi chép hàng ngày. Cá chết sẽ được thu để xác định lại vi khuẩn bằng phương pháp nhuộm Gram, soi tươi quan sát sự xuất hiện của vi khuẩn trên da, mang, phân lập và giám định nhanh bằng PCR. Liều gây chết 50% cá thí nghiệm (LD_{50}) được xác định theo công thức của Reed và Muench (1938) [15] như sau:

$$LD_{50} = 10^{a+x}, \text{ trong đó } x = (50 - PL)/(PH - PL)$$

Trong đó: a là số lũy thừa của nồng độ vi khuẩn tiêm mà tại đó gây chết cận dưới 50%; PH là tỷ lệ chết tích lũy cận trên 50%; PL là tỷ lệ chết tích lũy cận dưới 50%.

2.2.6. Phương pháp đánh giá mức độ nhạy/kháng của vi khuẩn với kháng sinh

Tổng số 27 chủng vi khuẩn *F. columnare* sau khi định danh thành công bằng phương pháp giám định PCR được đánh giá tình trạng kháng kháng sinh, sử dụng 6 loại kháng sinh được phép sử dụng trong nuôi trồng thủy sản bao gồm: Erythromycin (Er, 15 µg); amoxicillin (Ax, 10 µg); esulfamethoxazole/trimethoprim (BT, 23,75/1,25 µg); florfenicol (Fl, 30 µg); doxycycline (Dx, 30 µg), oxytetracycline (OTC, 30 µg). Các chủng vi khuẩn sau khi được nuôi cấy thuần trong môi trường lỏng Mueller Hinton Broth (MHB) pha loãng (4 g/L) sau 36 giờ ở nhiệt độ 28°C. Sau đó, dịch vi khuẩn sẽ được điều chỉnh về mật độ khoảng 1×10^8 CFU/ml ở mức 0,5 theo thang chuẩn McFarland và được tiếp tục pha loãng theo tỷ lệ 1: 100 bằng môi trường MHB. Tiến hành hút 50 µl dịch khuẩn sau pha loãng cấy đều lên đĩa thạch Mueller-Hinton (4 g/L MHB + 17 g/L agar). Các tấm kháng sinh (Oxoid, Hampshire, Anh) được đặt đều lên đĩa thạch sau khi cấy. Các đĩa kháng sinh được ủ ở nhiệt độ 28°C sau 48 giờ được tiến hành đo kích thước vòng vô khuẩn để đánh giá tính nhạy/kháng của 6 loại kháng sinh với vi khuẩn *F. columnare* theo CLSI (2016) [16], CLSI (2020) [17]. Sử dụng phương pháp đĩa kháng sinh khuếch tán cho nhóm vi khuẩn chuyển động trượt theo hướng dẫn của CLSI (2020) [17] để đánh giá mức độ kháng/nhạy của vi khuẩn *F. columnare* đối với kháng sinh.

2.2.7. Phương pháp xử lý số liệu

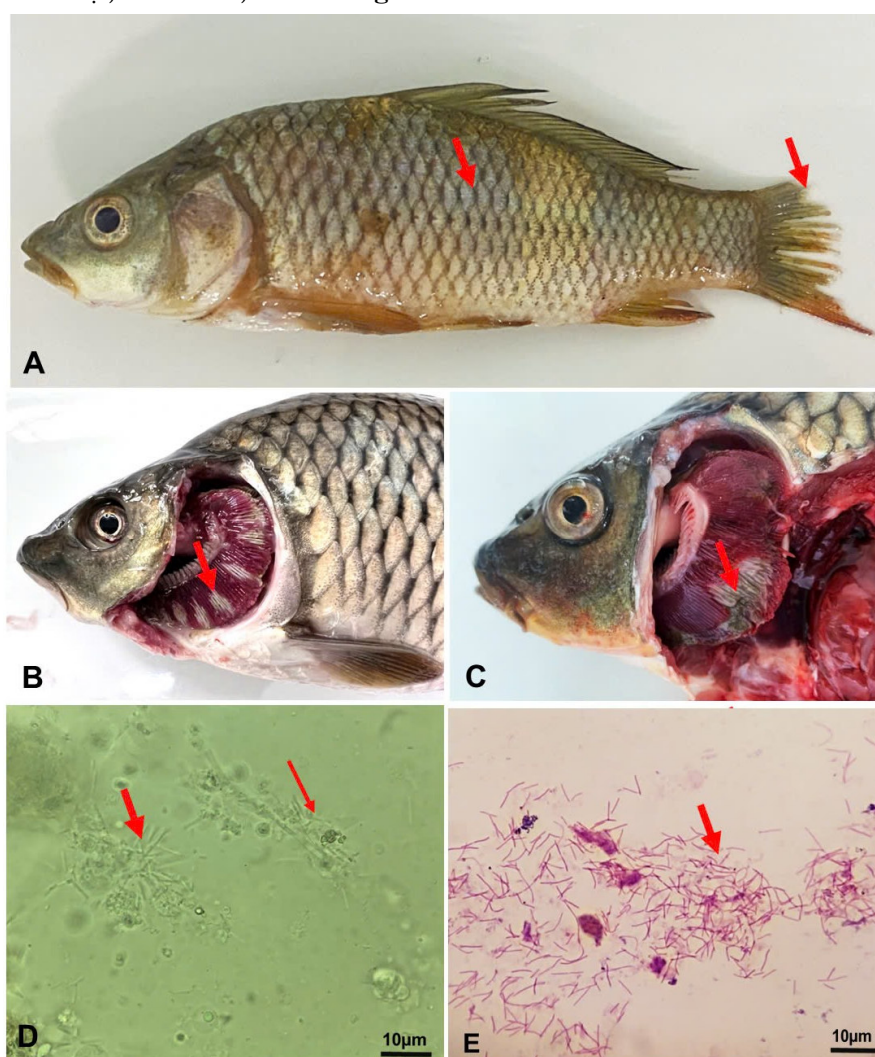
Số liệu về tỷ lệ cá chết tích lũy trong quá trình cảm nhiễm, mức độ kháng/nhạy của vi khuẩn với từng loại kháng sinh được tổng hợp và phân tích bằng phần mềm Excel 2016.

3. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU VÀ THẢO LUẬN

3.1. Kết quả sàng lọc mẫu và kiểm tra lâm sàng cá bệnh

Trong tổng số 145 mẫu cá chép có biểu hiện bạc da, xơ vảy, mang xơ trắng hoặc hoại tử (Hình 1A-C) được thu và sàng lọc từ 27 hộ nuôi tại 3 tỉnh/thành là: Hà Nội, Bắc Ninh, Hải Dương để

đưa vào phân lập vi khuẩn. Kết quả soi tươi và nhuộm Gram mẫu vùng mang, da tổn thương phát hiện vi khuẩn dạng mảnh, Gram (-), có khả năng di động trượt tập trung thành cụm tại đám chất nhầy trên tơ mang, da (Hình 1D, E). Tuy nhiên, kết quả giải phẫu không phát hiện đặc điểm bệnh tích trên cá bệnh, gan, thận cá một số mẫu chỉ có biểu hiện sưng nhẹ, không phát hiện vi khuẩn xâm nhập trong các cơ quan này. Kết quả về đặc điểm vi khuẩn khi soi tươi và nhuộm vi khuẩn đều tương đồng với kết quả nghiên cứu trước đây trên cá chép nhiễm *F. columnare* [18, 19].



Hình 1. Kết quả kiểm tra lâm sàng mẫu cá chép có biểu hiện bạc da, trắng mang

Ghi chú: A: Cá chép biểu hiện bạc da, xơ vảy; B, C: Mang bạc trắng hoặc hoại tử; D: Vi khuẩn Gram (-) dạng sợi mảnh ở vùng mang, da tổn thương khi soi tươi; E: Mẫu nhót mang tươi được nhuộm Gram.

Vi khuẩn *F. columnare* gây ảnh hưởng chủ yếu bên ngoài cơ thể cá, đặc biệt là mang, vây, da của cá và có thể gây nhiễm trùng toàn thân trong những trường hợp nghiêm trọng. Các tổn thương có mức độ nghiêm trọng khác nhau, từ đốm trắng bạc đến các mảng trắng gây xơ, mòn và xung huyết tiến triển thành tình trạng viêm lớn và các tổn thương hoại tử [20]. Các dấu hiệu đặc trưng của vi khuẩn *F. columnare* gây ra trên cá cũng đã được ghi nhận trên nhiều loại cá nước ngọt trên thế giới [21] và trên một số loại cá nước ngọt tại Việt Nam [9, 10]. Dấu hiệu đặc trưng như: Tia mang xơ, bạc màu xuất hiện các vùng trắng bạc và mất màu trên cơ thể cá bệnh ghi nhận được trên cá cá chép nhiễm *F. columnare* trong nghiên cứu này hoàn toàn tương đồng với các kết quả công bố trước đó trên cá chép [18], cá chép Koi [22]. Ngoài ra, các dấu hiệu này cũng được ghi nhận trên các loài khác như: Rô phi [9], trắm cỏ [10], tra [23], nheo Mỹ [11]. Các nghiên cứu đã chứng minh rằng, cá nhiễm *F. columnare* bị tổn thương mang nghiêm trọng, cá chết nhanh và ảnh hưởng tiêu cực đến phản ứng miễn dịch bẩm sinh và tăng các phản ứng gây viêm ở cá chép [19]. Các nghiên cứu trước đó cũng ghi nhận vi khuẩn *F. columnare* ít tấn công và nhiễm vào các cơ quan nội tạng [3], vì vậy không xuất hiện các bệnh tích ở nội quan của cá.

3.2. Kết quả phân lập và định dạng tác nhân gây bệnh

Cá có dấu hiệu đặc trưng là trắng da, mang đều có sự hiện diện của vi khuẩn và được phân lập thành công. Tổng số 27 chủng vi khuẩn đại diện của 27 hộ nuôi (1 chủng/hộ) được sử dụng để định danh. Các chủng vi khuẩn phát triển tốt trên môi trường dinh dưỡng TYES ở nhiệt độ 28°C sau 48 giờ, khuẩn lạc màu vàng, dạng rế lan rộng, có xu hướng bám chặt vào thạch.

Kết quả đánh giá cho thấy, 27/27 chủng đều có các đặc điểm về hình thái, sinh hóa của vi khuẩn *F. columnare* như: Khuẩn lạc vàng, dạng rế đặc trưng, lan rộng, lồi và bám sâu vào bề mặt thạch trên môi trường TYES. Kích thước khuẩn lạc khoảng 0,5 - 0,3 mm sau 36 - 48 giờ nuôi cấy. Nhuộm Gram vi khuẩn xác định vi khuẩn Gram âm, dạng sợi mảnh, kích thước khoảng 0,5 - 1,0 x 4 - 10 µm (Hình 2). Vi khuẩn có khả năng chuyển động trượt trên đĩa thạch, phản ứng dương tính với các thuốc thử catalase, oxidase, flexirubin và red congo. Các đặc điểm về hình thái và sinh hóa của vi khuẩn trong nghiên cứu này cũng được ghi nhận trong các nghiên cứu trước đó trên cá chép [18]. Các đặc điểm sinh hóa thu được đều tương đồng với các đặc điểm trên chủng chuẩn *F. columnare* ATCC 49513 (Bảng 1).



Hình 2. Hình thái khuẩn lạc và hình dạng vi khuẩn nghi *F. columnare* phân lập từ cá chép nhiễm bệnh

Ghi chú: A, B: Hình thái vi khuẩn *F. columnare* trên cytophagar sau 48 giờ nuôi cấy; C: Hình dạng vi khuẩn sau nuôi cấy thuần.

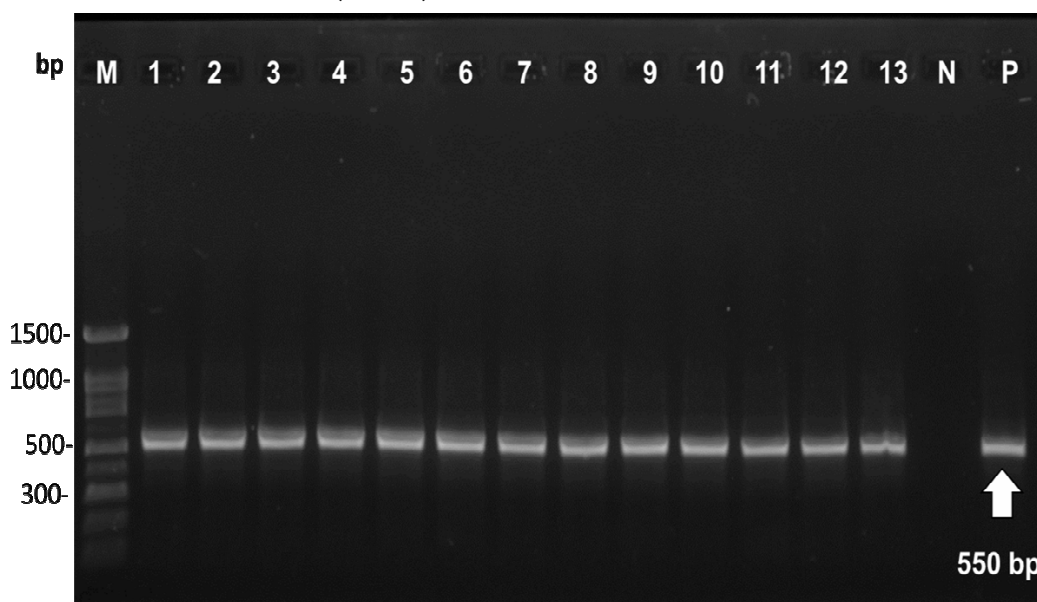
Bảng 1. Kết quả thử một số đặc tính hình thái, sinh hoá của các chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập được từ cá chép nhiễm bệnh

Đặc tính sinh thái, sinh hóa	Chủng phân lập từ cá chép nhiễm bệnh (n = 27)	Chủng chuẩn <i>F. columnare</i> ATCC 49513
Gram	-	-
Phát triển trên TSA	-	-
Hình thái khuẩn lạc trên cytophagar	Rẽ	Rẽ
Hình thái vi khuẩn	Sợi mảnh	Sợi mảnh
Di động trượt	+	+
Oxidase	+	+
Catalase	+	+
Flexirubin	+	+
Red congo	+	+

Ghi chú: (+): Phản ứng dương tính; (-): Phản ứng âm tính.

Kết quả giám định PCR đối với 27 chủng đại diện sau thử sinh hóa cho kết quả 27/27 chủng dương tính với đoạn mã đặc hiệu cho loài *F. columnare*, kích cỡ đoạn mã khoảng 550 bp, trùng với vị trí xuất hiện vạch của chủng đối chứng dương *F. columnare* ATCC 49513 (Hình 3). Kích

cỡ mỗi khoảng 550 bp thu được cũng tương đồng với kết quả PCR trên cá trích cỏ của Trương Đình Hoài và cs (2022) [10]. Qua quá trình đánh giá hình thái, sinh hóa và giám định bằng phương pháp PCR cho thấy, 27 chủng được đưa vào đánh giá đều là vi khuẩn *F. columnare*.



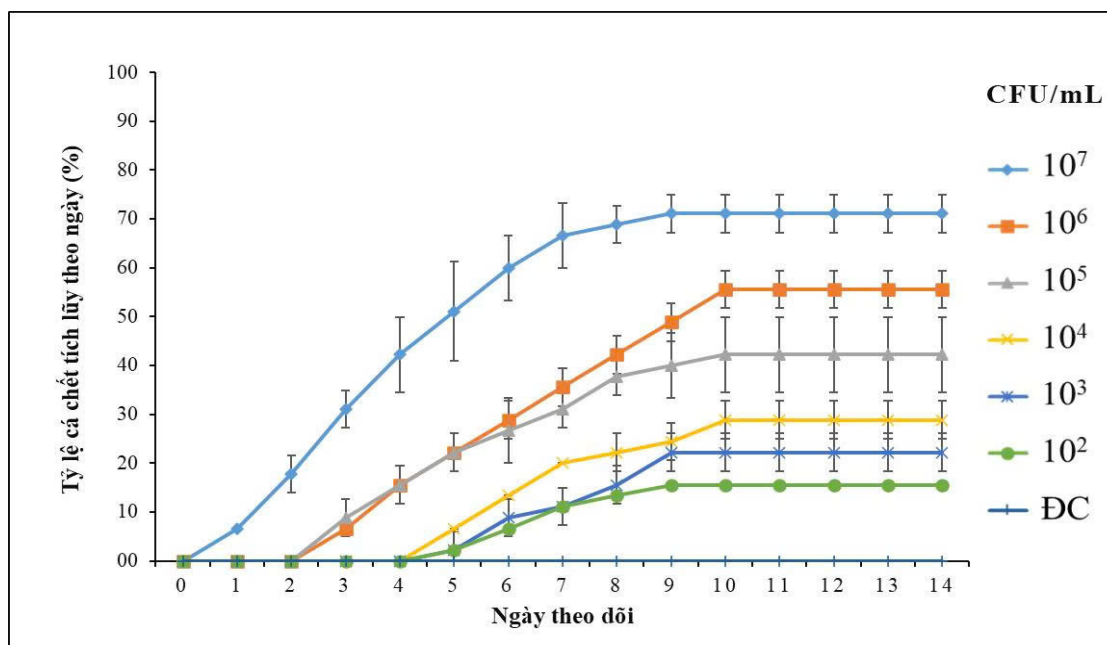
Hình 3. Kết quả giám định *F. columnare* đại diện từ cá chép bằng kỹ thuật PCR

Ghi chú: M: Marker. Giếng 1 - 13: 13 chủng vi khuẩn đại diện phân lập được từ cá chép nhiễm bệnh; N: Đối chứng âm; P: Đối chứng dương (chủng *F. columnare* ATCC 49513).

3.3. Kết quả xác định liều gây chết 50% (LD₅₀)

Kết quả theo dõi diễn biến cá chết sau khi cảm nhiễm vi khuẩn *F. columnare* trên cá chép sau 14 ngày theo dõi cho thấy, tại nồng độ cảm nhiễm cao nhất 10^7 CFU/mL, cá bắt đầu chết sau 24 - 48 giờ ngâm và tăng lên 71,1% sau 14 ngày theo dõi. Tại nồng độ thấp hơn 10^6 CFU/mL, tỷ lệ chết cá ở mức 6,7% sau 48 giờ ngâm, đạt 55,6% sau 14 ngày theo dõi. Trong khi đó, ở các nồng độ thấp (10^5 , 10^4 , 10^3 CFU/mL) tỷ lệ cá chết bắt đầu giảm, chỉ đạt mức 6,7 - 13,3% sau 3 - 5 ngày ngâm, với tỷ lệ chết tương ứng sau 14 ngày tiêm là: 42,2, 28,9, 22,2%. Ngoài ra, tại lô có nồng độ thấp nhất (10^2 CFU/mL), cá bắt đầu chết sau 5 ngày tiêm và chỉ đạt mức 15,6% sau 14 ngày theo dõi (Hình 4).

Kết quả phân tích liều gây chết LD₅₀ cho thấy, giá trị LD₅₀ của chủng là $3,8 \times 10^5$ CFU/mL. Quan sát biểu hiện cá cảm nhiễm tại các lô thí nghiệm cá trước khi chết đều có các dấu hiệu điển hình bao gồm: Lờ đờ, bơi gần mặt nước, nắp mang chuyển động nhanh, có các biểu hiện ngạt và thiếu khí. Sau khi thực hiện giải phẫu, kiểm tra cá thí nghiệm cho thấy, tất cả mẫu cá chết hoặc gần chết đều có các biểu hiện: Mang xuất hiện các vùng hoại tử và bạc màu, da xuất hiện các mảng nhợt nhạt mặc dù các đặc điểm bạc da chưa thể hiện rõ nét như cá mắc bệnh tự nhiên. Một số mẫu cá chết sau 7 - 10 ngày mang có biểu hiện tia mang xơ trắng, hoại tử nặng (Hình 5). Trong khi đó, tại lô đối chứng cá vẫn khỏe mạnh và không có các dấu hiệu bệnh lý bất thường.



Hình 4. Kết quả theo dõi tỷ lệ cá chết sau cảm nhiễm

Mức độ độc lực và khả năng gây bệnh của vi khuẩn *F. Columnare* trên cá chép trong nghiên cứu này khá tương đồng với kết quả nghiên cứu trước đó trên thế giới, nghiên cứu của Pradhan và cs (2019) [19] cảm nhiễm trên cá chép với giá trị LD₅₀ khoảng 6×10^6 CFU/mL. Ngoài ra, mức độ độc lực của vi khuẩn *F. columnare* trong nghiên cứu này cũng tương đồng với giá trị LD₅₀ trên cá rô phi vằn, dao động từ $1,1 \times 10^6$ - $3,2 \times 10^6$ CFU/mL [24]. Đặc tính độc lực và khả năng gây bệnh của vi khuẩn *F. columnare* liên quan khả năng gắn

bám lên bề mặt mang cá, khả năng hình thành lớp màng sinh học (biofilm) trên bề mặt mang cản trở hấp thụ oxygen và sản sinh capsular polysaccharide giúp xâm lấn hệ miễn dịch vật chủ [3, 25]. Các vùng tổn thương trên mang do vi khuẩn gây ra làm mang bị xơ, bạc trắng, gây cản trở hô hấp của cá, trong khi vùng tổn thương trên da ảnh hưởng đến khả năng điều hoà áp suất thẩm thấu của cơ thể, bội nhiễm các loài vi khuẩn gây bệnh khác, gây chết đối tượng nuôi [3, 18].



Hình 5. Cá chép nhiễm bệnh trong quá trình cảm nhiễm

Ghi chú: A: Cá cảm nhiễm có dấu hiệu đốm bạc màu trên da, mòn vảy và dễ bong vảy; B: Bạc và hoại tử mang; C: Vi khuẩn tập trung thành đám lớn trên các vùng tổn thương.

3.4. Mức độ kháng kháng sinh của vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trên cá chép

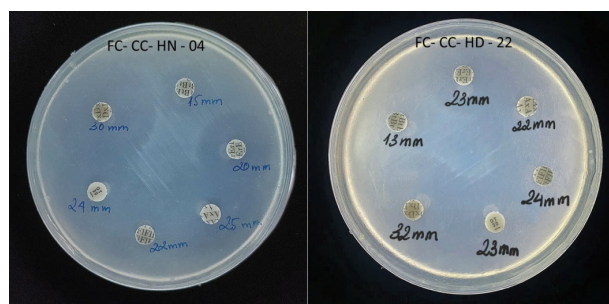
Kết quả đánh giá mức kháng/nhạy của 27 chủng vi khuẩn *F. columnare* phân lập từ cá chép nhiễm bệnh đối với 6 loại kháng sinh được phép sử dụng trong nuôi trồng thủy sản bao gồm: Doxycycline, florfenicol, amoxicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim, erythromycin, oxytetracycline. Kết quả thử nghiệm cho thấy, hầu hết các chủng vi khuẩn đều có độ nhạy cao với 5/6 loại kháng sinh được thử nghiệm, tỷ lệ nhạy dao động 70,4 – 96,3%. Tuy nhiên, ngoại trừ kháng sinh

sulfamethoxazole/trimethoprim (Bt) đã có xu hướng suy giảm với mức độ nhạy chỉ đạt 40,0% (Bảng 4). Ngoài ra, không có chủng vi khuẩn nào trong nghiên cứu này kháng với các loại kháng sinh doxycycline, amoxicillin, florfenicol, oxytetracycline; tỷ lệ nhạy với 4 loại kháng sinh này cũng đạt ở mức cao tương ứng là 96,3; 88,9; 92,6%; 88,9%. Bên cạnh đó, 70,4% số chủng nhạy với kháng sinh erythromycin và chỉ 7,4% chủng kháng với loại kháng sinh này, trong khi có đến 25,9% chủng có tỷ lệ kháng với hỗn hợp kháng sinh sulfamethoxazole/trimethoprim (Bt).

Bảng 4. Kết quả thử kháng sinh đồ đối với 27 chủng *F. columnare* phân lập từ cá chép

STT	Tên kháng sinh	Kí hiệu	Nhạy	Nhạy trung bình	Kháng
			n (%)		
1	Doxycycline	Dx	96,3	3,7	0,0
2	Sulfamethoxazole /trimethoprim	Bt	40,7	33,3	25,9
3	Amoxicillin	Ax	88,9	11,1	0,0
4	Erythromycin	Er	70,4	22,2	7,4
5	Florfenicol	Fl	92,6	7,4	0,0
6	Oxytetracycline	T30	88,9	11,1	0,0

Ghi chú: * TB: Trung bình



Hình 6. Thử kháng sinh đồ với 6 loại kháng sinh

Mức kháng/nhạy của vi khuẩn *F. columnare* trong nghiên cứu này tương đồng với các kết quả đã được công bố trước đó trên các loài cá nước ngọt khác [3, 10, 23]. Tỷ lệ nhạy cao đối với 5/6 loại kháng sinh ghi nhận được trong nghiên cứu cũng đã được Trương Đình Hoài và cs (2022) [10] báo cáo trên cá trắm cỏ. Tuy nhiên, tỷ lệ nhạy của hỗn hợp kháng sinh sulfamethoxazole/trimethoprim (Bt) trong nghiên cứu (40,0%) có mức nhạy thấp hơn so với *F. columnare* phân lập từ cá trắm cỏ (56%) [10] và cao hơn so với *F. columnare* phân lập từ cá tra (30%) [23]. Mặc dù vi khuẩn *F. columnare* mức nhạy cao đối với các loại kháng sinh trong các nghiên cứu này, việc điều trị thực tế đối với loại vi khuẩn này gặp rất nhiều khó khăn, do tình trạng kháng thuốc, vi khuẩn tập trung bên ngoài da, mang nên ít bị ảnh hưởng bởi kháng sinh theo đường ăn [10]. Do vậy, trong thời gian tới cần tập trung vào việc tìm kiếm các biện pháp phòng bệnh, điều chỉnh mật độ nuôi phù hợp và kiểm soát các thông số chất lượng nước, sử dụng vi sinh để ức chế vi khuẩn trong nước là giải pháp cần được nghiên cứu và triển khai để kiểm soát bệnh do vi khuẩn *F. Columnare* gây ra [3].

4. KẾT LUẬN

Cá chép nhiễm bệnh do *Flavobacterium columnare* gây ra có các dấu hiệu đặc trưng như: Mang xơ trắng, hoại tử, xơ vảy và bạc da. Các chủng phân lập được đều có khuẩn lạc vàng, dạng rẽ đặc trưng, bám sâu vào mặt thạch, vi khuẩn Gram âm, dạng sợi, di động. Kết quả cảm nhiễm bằng phương pháp ngâm xác định liều gây chết 50% (LD₅₀) của chủng đại diện là $3,8 \times 10^5$ CFU/ml, vi khuẩn phân lập được độc lực trên cá chép với các biểu hiện tương đồng với cá bị bệnh tự nhiên.

Vi khuẩn *F. columnare* gây bệnh trên cá chép có tỷ lệ nhạy với 5/6 loại kháng sinh là doxycycline, oxytetracycline, amoxicillin, florfenicol, erythromycin, trong khi tỷ lệ kháng với sulfamethoxazole/trimethoprim ở mức khá cao (25,9%).

LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn sự hỗ trợ của các hộ nuôi cá chép tại các tỉnh, sự hỗ trợ của nhóm sinh viên Khoa Thủy sản, Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã phối hợp thực hiện, tạo điều kiện thu mẫu để hoàn thành nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Nguyễn Văn Tuyền, Trần Thị Diệu, Phạm Thị Thắm, Đoàn Thị Ninh, Kim Văn Vạn, Trương Đình Hoài (2020). Thử nghiệm các phác đồ điều trị bệnh u nang đường ruột do bào tử sợi *Thelohanellus kitauei* trên cá chép (*Cyprinus carpio*). *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 18(12): 1139 - 1148.
2. Zhao, L., Lu, H., Meng, Q., Wang, J., Wang, W., Yang, L. & Lin, L (2016). Profilings of microRNAs in the liver of common carp (*Cyprinus carpio*) infected with *Flavobacterium columnare*. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(4), 566 - 579.
3. Declercq, A. M., Haesebrouck, F., Van den Broeck, W., Bossier, P. & Decostere, A. (2013). Columnaris disease in fish: A review with emphasis on bacterium-host interactions. *Veterinary research*, 44(1), 1 - 17.
4. Flemming, L., Rawlings, D. & Chenia, H (2007). Phenotypic and molecular characterisation of fish-borne *Flavobacterium johnsoniae*-like isolates from aquaculture systems in South Africa. *Research in Microbiology*, 158(1), 18 - 30.
5. Zhou, W., Zhang, Y., Wen, Y., Ji, W., Zhou, Y., Ji, Y., Liu, X., Wang, W., Asim, M. & Liang, X (2015). Analysis of the transcriptomic profilings of Mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) infected with *Flavobacterium columnare* with an emphasis on immune responses. *Fish & Shellfish Immunology*, 43(1), 111 - 119.
6. Shi, F., Lu, Z., Yang, M., Li, F., Zhan, F., Zhao, L., Li, Y., Li, Q., Li, J. & Li, J (2021). Astragalus polysaccharides mediate the immune response and intestinal microbiota in grass carp

- (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture*, 534, 736205.
7. Stringer - Roth, K., Yunghans, W. & Caslake, L (2002). Differences in chondroitin AC lyase activity of *Flavobacterium columnare* isolates. *Journal of Fish Diseases*, 25(11), 687 - 691.
 8. Suomalainen, L. R., Kunttu, H., Valtonen, E. T., Hirvelä-Koski, V. & Tiirola, M. (2006). Molecular diversity and growth features of *Flavobacterium columnare* strains isolated in Finland. *Diseases of aquatic organisms*, 70(1 - 2), 55 - 61.
 9. Đoàn Thị Ninh, Trần Thị Trinh, Đặng Thị Hóa, Nguyễn Ngọc Tuấn, Nguyễn Thị Hương Giang, Kim Văn Vạn, Đặng Thị Lệ, Trương Đình Hoài (2023). Nghiên cứu phân lập và một số đặc điểm bệnh học của *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá rô phi (*Oreochromis* spp.) tại miền Bắc, Việt Nam. *Bản B, Tạp chí Khoa học và Công nghệ Việt Nam*, 65(2), 41 - 47.
 10. Trương Đình Hoài, Đoàn Thị Ninh, Trần Thị Trinh, Đặng Thị Hóa, Nguyễn Ngọc Tuấn, Kim Văn Vạn (2022). Phân lập và đánh giá độ nhạy với kháng sinh của vi khuẩn *Flavobacterium columnare* gây bệnh trên cá trắm cỏ nuôi tại miền Bắc. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam*, 20(6): 732 - 740.
 11. Trương Đình Hoài, Đoàn Thị Ninh, Nguyễn Thị Hương Giang, Nguyễn Ngọc Tuấn, Kim Văn Vạn (2021). *Một số đặc điểm bệnh học của cá nheo Mỹ nuôi lồng nhiễm khuẩn Flavobacterium columnare*. Tuyển tập công trình khoa học của các tiến sĩ trẻ Nhật Bản. Nxb Đại học Quốc gia Hà Nội, 117 - 128.
 12. Cain, K. D. & LaFrentz, B. R (2007). Laboratory maintenance of *Flavobacterium psychrophilum* and *Flavobacterium columnare*. *Current protocols in microbiology*, 6(1), 13B. 11.11 - 13B. 11.12.
 13. Nicky B. Buller (2004). Bacteria from fish and other aquatic animals: A practical identification manual *Cabi*.
 14. Welker, T. L., Shoemaker, C. A., Arias, C. R. & Klesius, P. H (2005). Transmission and detection of *Flavobacterium columnare* in channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Diseases of aquatic organisms*, 63(2 - 3), 129 - 138.
 15. Reed, L. J and H. Muench (1938). A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *American Journal of Epidemiology*, 27, 493 - 497.
 16. CLSI (2016). Methods for antimicrobial dilution and disk susceptibility testing of infrequently isolated or fastidious bacteria. 3rd ed. *CLSI guideline M45. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*.
 17. CLSI (2020). Performance Standards for Antimicrobial Testing of Bacteria Isolated from Aquatic Animals. 3rd ed. *CLSI supplement VET04. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute*.
 18. Declercq, A. M., Chiers, K., Van den Broeck, W., Dewulf, J., Eeckhaut, V., Cornelissen, M., Bossier, P., Haesebrouck, F. & Decostere, A (2015). Interactions of highly and low virulent *Flavobacterium columnare* isolates with gill tissue in carp and rainbow trout. *Veterinary research*, 46, 1 - 16.
 19. Pradhan, P. K., Pande, V., Yadav, M. K., Verma, D. K. & Sood, N. (2019). Modulation of the innate immune responses in Indian major carp, *Catla catla* following experimental infection with *Flavobacterium columnare*. *Aquaculture*, 510, 22 - 31.
 20. Hassanien, H. A., Alrashada, Y. N., Abbas, A. O. & Abdelwahab, A. M (2023). Dietary propolis complementation relieves the physiological and growth deterioration induced by *Flavobacterium columnare* infection in juveniles of common carp (*Cyprinus carpio*). *Plos one*, 18(10), e0292976.
 21. LaFrentz, B. R., Králová, S., Burbick, C. R., Alexander, T. L., Phillips, C. W., Griffin, M. J., Waldbieser, G. C., García, J. C., de Alexandre Sebastião, F., & Soto, E (2022). The fish pathogen *Flavobacterium columnare* represents four distinct species: *Flavobacterium columnare*, *Flavobacterium covae* sp. nov., *Flavobacterium davisii* sp. nov. and *Flavobacterium oreochromis* sp. nov., and emended description of *Flavobacterium columnare*. *Systematic and Applied Microbiology*, 45(2), 126293.

22. Decostere, A., Ducatelle, R., & Haesebrouck, F. (2002). *Flavobacterium columnare* (*Flexibacter columnaris*) associated with severe gill necrosis in koi carp (*Cyprinus carpio* L). *Veterinary Record*, 150 (22), 694 - 695.
23. Từ Thanh Dung, Nguyễn Thị Tiên, Nguyễn Anh Tuấn (2012). Nghiên cứu tác nhân gây bệnh trắng đuôi trên cá tra (*Pangasianodon hypophthalmus*) và giải pháp điều trị. *Tạp chí Khoa học*, (22c), 136 - 145.
24. Moyer, T. R., & Hunnicutt, D. W (2007). Susceptibility of zebra fish *Danio rerio* to infection by *Flavobacterium columnare* and *F. johnsoniae*. *Diseases of aquatic organisms*, 76(1), 39 - 44.
25. Hai, L. D., Chockmangmeepisan, P., Sakulworakan, R., Dong, H. T., Kayansamruaj, P., Rung-ruangkijkrai, T., Pirarat, N., & Rodkhum, C (2020). Virulence properties and pathogenicity of *Flavobacterium columnare* in hybrid red tilapia (*Oreochromis* sp.). *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 50(1), 103 - 108.

ISOLATION AND EVALUATION OF ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF *Flavobacterium columnare* CAUSING DISEASE IN FARMED COMMON CARP IN NORTHERN VIETNAM

**Truong Dinh Hoai¹, Dang Thi Hoa¹, Tran Thi Trinh¹, Nguyen Thi Thanh Loan²,
Nguyen Van Phong¹, Nguyen Thi Huong Giang³, Doan Thi Ninh¹, Kim Van Van¹**

¹*Faculty of Fisheries, Vietnam National University of Agriculture*

²*Faculty of Veterinary Medicine, Vietnam National University of Agriculture*

³*National Centre for Veterinary Diagnosis*

Abstract

The study was conducted to identify specific disease characteristics, isolate, identify and evaluate the antibiotic resistance status of the bacterium *Flavobacterium columnare*, which causes disease in common carp in some northern provinces of Vietnam. A total of 145 samples of suspected *F. columnare*-infected common carp were collected from 27 farms across three provinces: Ha Noi, Hai Duong, Bac Ninh. The results showed that infected common carp exhibited typical signs such as pale gills, necrosis, fin erosion and discolored skin. The isolated strains displayed yellow colonies with a characteristic root-like appearance, adhered deeply to agar surfaces, and were identified as gram-negative, filamentous, motile bacteria. Biochemical and molecular assessments confirmed that all 27 isolates were *Flavobacterium columnare*. The experimental challenge tests using an immersion method with a representative strain determined the lethal dose 50% (LD₅₀) as 3.8×10^5 CFU/ml, and infected fish showed typical symptoms of the natural disease. *F. columnare* was found to have high sensitivity to five out of six antibiotics: Doxycycline, Oxytetracycline, Amoxicillin, Florfenicol, Erythromycin, while showing a relatively high resistance rate (25.9%) to Sulfamethoxazole/Trimethoprim. These findings provide crucial information for diagnosing and forming the basis for developing preventive and control measures for the disease.

Keywords: *Flavobacterium columnare*, isolation, antibiotic resistance, common carp.

Ngày nhận bài: 01/8/2024

Ngày gửi phản biện: 27/8/2024

Ngày thông qua phản biện: 22/10/2024

Ngày duyệt đăng: 20/5/2025